

10/089214

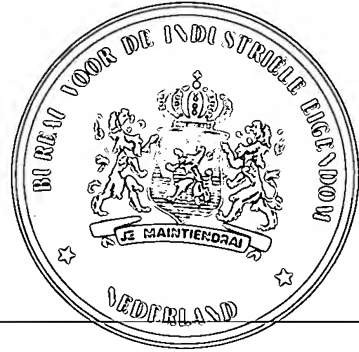
JC13 PCT/PTO 25 MAR 2002

KONINKRIJK DER



NEDERLANDEN

Bureau voor de Industriële Eigendom



This is to declare that in the Netherlands on October 27, 1999 under No. 1013404,  
in the name of:

**DSM N.V.**

in Heerlen

a patent application was filed for:

"Werkwijze voor de bereiding van een dipeptide en tussenproduct in een dergelijke werkwijze",

("Process for the preparation of a dipeptide and intermediate product in such a process")

and that the documents attached hereto correspond with the originally filed documents.

Rijswijk, February 22, 2002.

In the name of the president of the Netherlands Industrial Property Office

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'N.A. Oudhof'.

N.A. Oudhof

UITTREKSEL

Werkwijze voor de bereiding van een N-  
5 formyl-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide waarbij  
N-formyl L-leucine wordt gekoppeld met L-tert.-leucine-  
N-methylamide in aanwezigheid van een  
activeringsmiddel. Bij voorkeur wordt L-tert.-leucine-  
N-methylamide met een enantiomere overmaat groter dan  
10 98% en N-formyl-L-leucine met een enantiomere overmaat  
groter dan 98% toegepast. Desgewenst wordt het  
verkregen dipeptide vervolgens gedeformyleerd en wordt  
het verkregen N-formyl-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-  
methylamide of het L-leucyl-L-tert.-leucine-N-  
15 methylamide nog onderworpen aan een of meerdere  
kristallisaties.

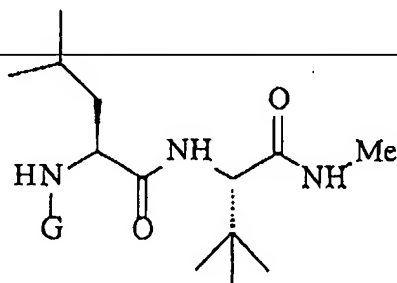
De uitvinding betreft tevens het N-formyl-  
L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide, en de  
toepassing van N-formyl-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-  
20 methylamide in de bereiding van farmaceutica.

- 1 -

PN 3956

WERKWIJZE VOOR DE BEREIDING VAN EEN DIPEPTIDE EN  
TUSSENPRODUCT IN EEN DERGELIJKE WERKWIJZE

De uitvinding betreft een werkwijze voor de  
bereiding van dipeptide met formule 1



(1)

waarin G een beschermgroep voorstelt waarbij N-  
beschermd L-leucine wordt gekoppeld met L-tert.-  
leucine-N-methylamide in aanwezigheid van een  
activeringsmiddel.

Uit WO-A-96/11209 is een dergelijke  
werkwijze bekend waarbij N-(1,1-dimethylethoxy)  
carbonyl-L-leucine en L-tert.-leucine-N-methylamide  
worden gekoppeld.

Nadeel van de bekende werkwijze is dat  
hierin dure beschermgroepen worden gebruikt, waardoor  
het proces commercieel minder aantrekkelijk is. De  
uitvinding voorziet nu in een commercieel  
aantrekkelijke route voor de bereiding van bovengenoemd  
tussenproduct in de bereiding van bijvoorbeeld de  
farmaceutica als beschreven in WO-A-96/11209.

Dit wordt volgens de uitvinding bereikt  
door als beschermgroep een formylgroep toe te passen.

Dipeptide koppelingen waarbij twee  
aminozuren worden gekoppeld zijn algemeen bekend en

- 2 -

uitvoerig beschreven in de literatuur. Bij deze koppelingen reageert de geactiveerde zuurgroep van het uiteindelijke N-terminale aminozuur met de aminogroep van het uiteindelijke C-terminaal aminozuur of

5 aminozuur-derivaat. Daarbij wordt de aminogroep van het uiteindelijke N-terminale aminozuur beschermd met behulp van een beschermgroep. In de werkwijze volgens de uitvinding worden twee enantiomeer verrijkte aminozuren gekoppeld. De enantiomere overmaat van de enantiomeer

10 verrijkte aminozuren is bij voorkeur groter dan 80%, in het bijzonder groter dan 90%, meer in het bijzonder groter dan 98%. Het is bekend dat bij de koppeling van de aminozuren racemisatie van het N-terminale aminozuur kan optreden. Dit is met name het geval wanneer een  
15 formyl-beschermgroep wordt toegepast, zoals bijvoorbeeld beschreven in de handboeken Houben-Weyl, Band 15/1 (1974), blz. 166, en The Peptides, Academic Press 1979, Volume 1, blz. 279. Bijgevolg worden formyl-beschermgroepen bij een koppeling van  
20 enantiomeer verrijkte aminozuren niet overwogen. Aanvraagster heeft nu gevonden dat bij de koppeling volgens de uitvinding, waarbij een formylgroep als beschermgroep wordt toegepast, geen of slechts weinig racemisatie optreedt. Bovendien heeft aanvraagster  
25 gevonden dat mocht er racemisatie optreden, juist dit koppelingsproduct volgens de uitvinding, bijzonder goed via kristallisatie kan worden verrijkt in de gewenste diastereomere vorm.

Een bijkomend voordeel van de werkwijze  
30 volgens de uitvinding is dat in de werkwijze goedkope activeringsmiddelen kunnen worden toegepast.

Het N-formyl-L-leucine dat wordt toegepast in de werkwijze volgens de uitvinding kan bijvoorbeeld op bekende wijze worden bereid door L-leucine in

- 3 -

contact te brengen met mierzuur en bijvoorbeeld een anhydride. Bij voorkeur wordt azijnzuuranhydride toegepast.

Het L-tert.-leucine-N-methylamide kan  
5 bijvoorbeeld worden bereid uit L-tert.-leucine via de omzetting van L-tert.-leucine en fosgeen in L-tert.-leucine-N-carboxyanhydride, dat vervolgens met behulp van N-methylamine wordt omgezet in L-tert.-leucine-N-methylamide.

10 In de werkwijze volgens de uitvinding wordt het N-formyl-L-leucine geactiveerd met behulp van een activeringsmiddel, bij voorkeur een sterisch gehinderd zuurchloride of een alkylchloorformiaat, en een base. Dergelijke activeringstappen zijn algemeen bekend en  
15 worden veel toegepast in peptidekoppelingen. De toe te passen basen zijn dan ook bij voorkeur de bekende basen die in deze activeringstappen worden toegepast, waarbij weinig racemisatie optreedt. Bij voorkeur wordt als base N-methylmorpholine toegepast.

20 De temperatuur waarbij de activering wordt uitgevoerd is niet bijzonder kritisch en ligt in de praktijk veelal tussen -30°C en +30°C, bij voorkeur tussen -20°C en +10°C.

Desgewenst wordt de activering uitgevoerd  
25 in een, bij voorkeur in het reactiemengsel inert, oplosmiddel. Geschikte oplosmiddelen zijn bijvoorbeeld esters, in het bijzonder ethylacetaat, isopropylacetaat en isobutylacetaat, ethers, in het bijzonder tetrahydrofuraan (THF), methyl-tert.-butylether (MTBE)  
30 en dioxaan, en nitrillen, in het bijzonder acetonitril.

Vervolgens wordt de koppeling uitgevoerd. Hiertoe wordt het geactiveerde N-formyl-L-leucine in contact gebracht met het L-tert.-leucine-N-methylamide.

- 4 -

Bij voorkeur wordt daarbij een oplossing van L-tert.-leucine-N-methylamide toegepast.

Voor de temperatuur waarbij de koppeling plaatsvindt geldt in principe hetzelfde als voor de  
5 temperatuur waarbij de activering wordt uitgevoerd. Bij voorkeur is de koppelingstemperatuur ongeveer gelijk aan de activeringstemperatuur. Geschikte oplosmiddelen voor het L-tert.-leucine-N-methylamide zijn bijvoorbeeld alcoholen, in het bijzonder methanol,

---

10 ethanol en isopropanol, esters, in het bijzonder ethylacetaat, isopropylacetaat en isobutylacetaat, ethers, in het bijzonder THF, MTBE en dioxaan.

Het verkregen N-formyl-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide kan vervolgens op algemeen  
15 bekende wijze worden gedeformyleerd, bijvoorbeeld in zuur milieu. De deformylering kan bijvoorbeeld worden uitgevoerd in waterig milieu, in water/alcohol mengsels of in een twee-fasen systeem.

De temperatuur waarbij de deformylering  
20 wordt uitgevoerd ligt bijvoorbeeld tussen 20°C en 110°C, bij voorkeur tussen 40°C en 80°C.

Het verkregen N-formyl-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide of L-leucyl-L-tert -leucine-N-methylamide kan desgewenst worden gezuiverd,  
25 bijvoorbeeld door het te onderwerpen aan een kristallisatie. Verrassenderwijze is gebleken dat door de kristallisatie de enantiomere overmaat van het N-terminale aminozuur in het al dan niet beschermde dipeptide kan worden verhoogd in die gevallen waarin  
30 bij de peptidekoppeling racemisatie is opgetreden.

Geschikte oplosmiddelen die bij de kristallisatie kunnen worden toegepast zijn bijvoorbeeld, koolwaterstoffen, in het bijzonder

- 5 -

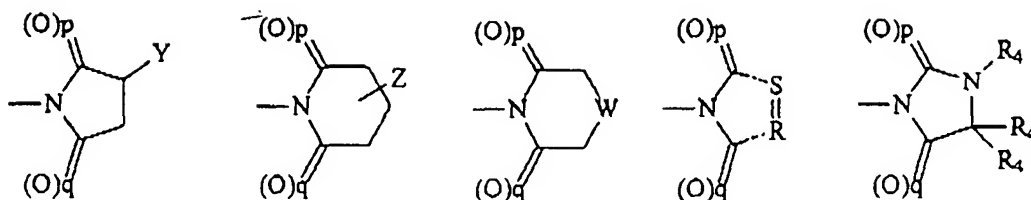
heptaan en hexaan; esters, in het bijzonder isopropylacetaat, isobutylacetaat en ethylacetaat; ethers, in het bijzonder MTBE; alcoholen, in het bijzonder methanol, ethanol, isopropanol en butanol; of  
5 mengsels daarvan. Een geschikt mengsel van oplosmiddelen is bijvoorbeeld een mengsel van heptaan en isopropylacetaat toegepast.

De temperatuur waarbij de kristallisatie wordt uitgevoerd is niet bijzonder kritisch en is  
10 voornamelijk afhankelijk van de fysische parameters van het gekozen oplosmiddel, in het bijzonder het kookpunt. In de praktijk zal de kristallisatie veelal bij een temperatuur tussen 20°C en 100°C worden uitgevoerd.

Afhankelijk van de exacte uitvoeringsvorm  
15 van de peptidekoppeling, kan het van voordeel zijn om het verkregen tussenproduct N-formyl-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide te isoleren via bijvoorbeeld extractie of kristallisatie.

Het verkregen L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide kan bijvoorbeeld worden toegepast in de  
20 bereiding van farmaceutica, bijvoorbeeld de N-( $\alpha$ -eventueel gesubstitueerd mercaptocarboxyl)-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide verbindingen zoals beschreven in WO-A-96/11209 en WO-A-97/12902. De  $\alpha$ -  
25 eventueel gesubstitueerde mercaptocarboxylgroep staat hier bijvoorbeeld voor een groep met formule  $R_1S-C(R_2)-C(O)-$  waarin  $R_1$  staat voor H of  $R_3CO$  waarin  $R_3$  een  $C_{1-4}$  alkyl, ( $C_{1-4}$  alkyl)aryl-, ( $C_{1-6}$  alkyl)heteroaryl-,  $C_{3-6}$  cycloalkyl-, ( $C_{3-6}$  cycloalkyl) $C_{1-4}$  alkyl-,  $C_{2-6}$  alkenyl-,  
30 ( $C_{2-6}$  alkenyl)aryl-, aryl- of heteroarylgroep is; en  $R_2$  staat voor H of een  $C_{1-4}$  alkyl-C(O)-A- of  $C_{1-4}$  alkyl-NH-C(O)-A-groep waarin A staat voor

- 6 -



p en q zijn elk onafhankelijk 0 of 1

$R_4$  = H of een  $C_{1-6}$  alkylgroep (elke  $R_4$  onafhankelijk van de andere)

Y en Z zijn elk onafhankelijk H of  $(C_{0-4} \text{ alkyl})R_5$  waarin  $R_5$  is  $NHR_4$ ,  $N(R_4)_2$  ( $R_4$  elk onafhankelijk),  $COOR_4$ ,  $CONHR_4$ ,  $NHCO_2R_4$ ,  $NHSO_2R_4$  of  $NHCOR_4$  en

W is O,  $S(O)_m$  met  $m = 0, 1$  of  $2$ , of  $NR_6$

10  $R_6$  = H,  $C_{1-4}$  alkyl,  $COR_7$ ,  $CO_2R_7$ ,  $CONHR_7$  of  $SO_2R_7$

$R_7$  = H,  $C_{1-4}$  alkyl, aryl, heteroaryl,  $(C_{1-4} \text{ alkyl})\text{aryl}$  of  $(C_{1-4} \text{ alkyl})\text{heteroaryl}$ .

R en S zijn elk onafhankelijk CH of N.

Deze verbindingen kunnen op bekende wijze worden bereid

15 door bijvoorbeeld een al dan niet gesubstitueerd  $\alpha$ -mercaptocarbonsuur te activeren en te koppelen met het volgens de uitvinding verkregen dipeptide L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide gebruikmakend van klassieke peptide koppelingstechnieken, zoals bijvoorbeeld

20 beschreven in WO-A-96/11209 en WO-A-97/12902.

De uitvinding zal nu verder worden toegelicht aan de hand van voorbeelden, zonder evenwel daardoor te worden beperkt.



- 7 -

Voorbeeld I -Bereiding van N-formyl-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide uit N-formyl-L-leucine en L-tert.-leucine-N-methylamide

5                   Aan een oplossing van N-formyl-L-leucine (8,0 gram, 50 mmol) in tetrahydrofuraan (125 ml) werd onder stikstof bij  $-18^{\circ}\text{C}$  isobutylchloroformiaat (6,5 gram, 48 mmol) gedoseerd. Vervolgens werd N-methylmorpholine (4,8 gram, 48 mmol) toegedruppeld in  
10 een zodanig tempo dat de temperatuur  $< -15^{\circ}\text{C}$  bleef. Er ontstond een neerslag.

Na 15 minuten naroeien werd een oplossing van L-tert.-leucine-N-methylamide (6,5 gram, 45 mmol) in tetrahydrofuraan (50 ml) gedoseerd zodanig dat de  
15 temperatuur  $< -15^{\circ}\text{C}$  bleef. Vervolgens werd 1 uur nageroerd bij  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Het reactiemengsel werd verwarmd tot  $0^{\circ}\text{C}$  en bij deze temperatuur werd water toegevoegd (100 gram). Hierna werd onder vacuüm THF afgedestilleerd.  
20 Isopropylacetaat (75 ml) werd toegevoegd en het reactiemengsel werd op  $\text{pH}=1,5$  gebracht met zoutzuur. Na lagen scheiden werd de waterfase tweemaal geëxtraheerd met respectievelijk 50 en 35 ml isopropylacetaat. De verzamelde organische fases werden vervolgens gewassen  
25 met 50 en 25 ml verzadigde natriumbicarbonaat oplossing en tenslotte met 25 ml water. De organische fase werd vervolgens onder vacuüm ingedampt.

Er werd N-formyl-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide verkregen in goede opbrengst, en met een  
30 e.e. (L-leucine fragment) van 99 % (HPLC)

- 8 -

Voorbeeld II -Bereiding van L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide  
uit N-formyl-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide

- 11,7 g (41 mmol) N-formyl-L-leucyl-L-tert.-  
5 leucine-N-methylamide (zie voorbeeld I) werd  
gesuspenseerd in 1M HCl (100 ml) en verwarmd naar 40 °C.  
Na 18 uur roeren bij deze temperatuur (alles ging in  
oplossing) werd afgekoeld naar kamertemperatuur en  
éénmaal geëxtraheerd met 50 ml isopropylacetaat. Na  
10 lagen scheiden werd de pH van de waterfase met 50 %-ige  
natronloog oplossing naar 10 gebracht. Er werd twee  
maal geëxtraheerd met isopropylacetaat (75 ml). De  
verzamelde organische fases werden onder vacuüm  
ingedampt.
- 15 Residu werd gesuspenseerd in heptaan  
(75 ml) en verwarmd tot 65 °C. Er werd zoveel  
isopropylacetaat toegevoegd tot alles net oploste. Na  
kristallisatie door middel van afkoelen naar  
kamertemperatuur en filtreren werd twee maal gewassen  
20 met heptaan (25 ml) en het materiaal gedroogd.  
L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide werd in geode  
opbrengst verkregen met een  
Zuiverheid = >98% (HPLC)  
e.e. (L-leucine fragment) van 99 % (HPLC)

- 9 -

Voorbeeld III-Bereiding van N-formyl-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide uit N-formyl-L-leucine en L-tert.-leucine-N-methylamide

5                   Aan een suspensie van N-formyl-L-leucine (15,9 gram, 100 mmol) in isopropylacetaat (85ml) werd onder stikstof bij -15 °C isobutylchloroformiaat (12,3 gram, 90 mmol) gedoseerd. Vervolgens werd N-methylmorpholine (9,1 gram, 90 mmol) in isopropylacetaat  
10 (25 ml) toegedruppeld in een zodanig tempo dat de temperatuur < -10 °C bleef.

Na 90 minuten naroeien werd de gevormde suspensie gedoseerd aan een gekoelde oplossing van L-tert.-leucine-N-methylamide (13,0 gram, 90 mmol) in  
15 methanol (65 ml) zodanig dat de temperatuur < -10 °C bleef. Vervolgens werd 30 minuten nageroerd bij -10 °C.

Het reactiemengsel werd verwarmd tot kamertemperatuur en bij deze temperatuur 2 uur nageroerd. Aan het reactiemengsel werd 100 ml water  
20 toegevoegd en m.b.v. 37%-ige waterige zoutzuuroplossing werd de pH naar 1,0 gebracht. Na lagen scheiden werd de waterfase nagewassen met 2 maal 75 ml isopropylacetaat. De verzamelde organische fases werden vervolgens gewassen met respectievelijk 100 en 50 ml verzadigde  
25 natriumbicarbonaat oplossing.

De organische fase werd vervolgens onder vacuüm ingedampt. Er werd N-formyl-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide verkregen met een e.e. (L-leucine fragment) van 98 % (HPLC).

- 10 -

Voorbeeld IV

Bereiding van N-formyl-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide uit N-formyl-L-leucine en L-tert.-leucine-N-methylamide

5 N-formyl-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide werd bereid zoals beschreven in voorbeeld III. Alleen bij temperaturen tussen 0-5 °C.

Er werd N-formyl-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide verkregen met een e.e. (L-leucine fragment) van

10 86 % (HPLC).

Voorbeeld V

Bereiding van L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide uit N-formyl-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide

15 Het materiaal verkregen in voorbeeld IV werd behandeld zoals beschreven in voorbeeld II.

Er werd L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide verkregen met een e.e. (L-leucine fragment) van 95 % (HPLC).

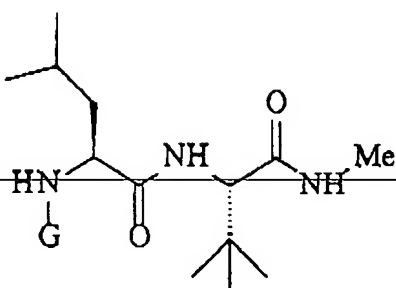
20

- 11 -

CONCLUSIES

1. Werkwijze voor de bereiding van dipeptide met formule 1

5



- waarin G een beschermgroep voorstelt  
waarbij N-beschermd L-leucine wordt gekoppeld met  
10 L-tert.-leucine-N-methylamide in aanwezigheid van  
een activeringsmiddel, met het kenmerk, dat als  
beschermgroep een formylgroep wordt toegepast.
2. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2 waarin het L-  
tert.-leucine-N-methylamide een enantiomere  
15 overmaat groter dan 98% heeft.
3. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2 waarin het N-  
formyl-L-leucine een enantiomere overmaat groter  
dan 98% heeft.
4. Werkwijze volgens een der conclusies 1-3 waarin  
20 het verkregen N-formyl-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-  
methylamide vervolgens wordt onderworpen aan een  
of meerdere kristallisaties.
5. Werkwijze volgens een der conclusies 1-4, waarin  
het verkregen dipeptide vervolgens wordt  
25 gedeformyleerd.
6. Werkwijze volgens conclusie 5 waarin het verkregen  
L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide vervolgens  
wordt onderworpen aan een of meerdere

- 12 -

kristallisaties.

7. Werkwijze volgens conclusie 5 of 6, waarin het L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide vervolgens wordt gekoppeld met een al dan niet gesubstitueerd  
5  $\alpha$ -mercaptocarbonsuur tot het overeenkomstige N- $\alpha$ -eventueel gesubstitueerd mercaptocarboxyl-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide.
8. N-formyl-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide.
9. N-formyl-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methyl-amide  
10 met een enantiomere overmaat van het N-terminale aminozuur in het dipeptide van meer dan 80%.
10. N-formyl-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methyl-amide met een enantiomere overmaat van het N-terminale aminozuur in het dipeptide van meer dan 98%.
- 15 11. N-formyl-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methyl-amide volgens conclusie 9 of 10 met een diastereomere overmaat van meer dan 80%.
12. N-formyl-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide volgens conclusie 11 met een diastereomere  
20 overmaat van meer dan 98%.
13. Toepassing van N-formyl-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide volgens een der conclusies 8-12 in de bereiding van farmaceutica.

UITTREKSEL

Werkwijze voor de bereiding van een N-  
5 formyl-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide waarbij  
N-formyl L-leucine wordt gekoppeld met L-tert.-leucine-  
N-methylamide in aanwezigheid van een  
activeringsmiddel. Bij voorkeur wordt L-tert.-leucine-  
N-methylamide met een enantiomere overmaat groter dan  
10 98% en N-formyl-L-leucine met een enantiomere overmaat  
groter dan 98% toegepast. Desgewenst wordt het  
verkregen dipeptide vervolgens gedeformyleerd en wordt  
het verkregen N-formyl-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-  
methylamide of het L-leucyl-L-tert.-leucine-N-  
15 methylamide nog onderworpen aan een of meerdere  
kristallisaties.

De uitvinding betreft tevens het N-formyl-  
L-leucyl-L-tert.-leucine-N-methylamide, en de  
toepassing van N-formyl-L-leucyl-L-tert.-leucine-N-  
20 methylamide in de bereiding van farmaceutica.